Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация и проведение вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы

Методические указания
МУК 4.2.2357—08

Издание официальное

Москва • 2009

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация и проведение вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы

Методические указания
МУК 4.2.2357—08

БК 51.9
О64

О64 **Организация** и проведение вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.—28 с.

ISBN 978—5—7508—0870—0

1. Разработаны ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН (О. Е. Иванова, Т. П. Еремеева, С. Г. Дроздов, М. И. Михайлов, О. Ю. Байкова, О. В. Юрашко); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Ф. Лазикова, Е. Б. Ежлова); ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (Т. В. Воронцова, А. А. Ясинский, О. П. Чернявская) с учетом замечаний и предложений ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в г. Москве, Ставропольском, Хабаровском краях, Омской, Свердловской областях; Санкт-Петербургского НИИЭМ им. Пастера.

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (от 3 апреля 2008 г. протокол № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 4 мая 2008 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.9

Редакторы Н. В. Кожока, Е. В. Николаева
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 30.11.09

Формат 60x88/16 | Печ. л. 1,75
Тираж 500 экз. | Заказ 87

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

1. Область применения 4
2. Общие положения 4
3. Организация вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы 5
4. Показания к применению вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы 6
5. Правила сбора, маркировки, хранения и транспортирования материалов для исследования 8
6. Обработка проб из объектов окружающей среды в лаборатории 10
7. Порядок проведения лабораторных исследований 11
8. Сроки хранения материалов, полученных из объектов окружающей среды 16
9. Обеспечение биологической безопасности при проведении вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы 17
10. Интерпретация результатов, полученных при проведении вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы 18
Приложение 1. Нормативные и методические ссылки 20
Приложение 2. Концентрирование проб сточных вод методом двухфазного разделения 23
Приложение 3. Сбор проб воды с помощью пакетов с макропористым стеклом и последующая обработка 25
Приложение 4. Направление на вирусологическое исследование материалов из объектов окружающей среды 27
Приложение 5. Список лабораторий Российской Федерации по диагностике полиомиелита 28

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав,
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
4 мая 2008 г.
Дата введения: 1 августа 2008 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация и проведение вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы

Методические указания
МУК 4.2.2357—08

1.Область применения

1.1. Настоящие методические указания предназначены для специалистов органов и учреждений государственного санитарно-эпидемиологического надзора при реализации национального плана действий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации.

1.2. В методических указаниях определены требования к организации сбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторных исследований материалов из объектов окружающей среды, выполняемых в целях выявления циркуляции полиовирусов, других (неполио) энтеровирусов, а также для установления причин, факторов передачи инфекции при повышенной заболеваемости или при эпидемических вспышках заболеваний энтеровирусной этиологии.

1.3. Методические указания также могут быть использованы специалистами организаций, эксплуатирующих системы централизованного хозяйственно-бытового водоснабжения, системы канализования, в рамках осуществления производственного контроля.

2. Общие положения

2.1. Вирусологические исследования материалов из объектов окружающей среды (далее – ООС) на полиовирусы, другие (неполио) энте-

ровирусы (далее – ПОЛИО/НПЭВ) являются одним из важнейших элементов системы эпидемиологического надзора за полиомиелитом и острыми вялыми параличами (далее – ПОЛИО/ОВП), другими энтеровирусными инфекциями, осуществляемого в рамках реализации национального плана действий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации.

2.2. Все процедуры по сбору, транспортированию, подготовке к исследованию и лабораторному исследованию материалов из ООС на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы осуществляется в строгом соответствии с требованиями нормативных и методических документов (прилож. 1).

2.3. Выполнение требований методических указаний направлено на совершенствование эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП, энтеровирусными инфекциями.

3. Организация вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы

3.1. Вирусологические исследования материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие НПЭВ проводят вирусологические лаборатории ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, вирусологические лаборатории региональных центров эпидемиологического надзора за полиомиелитом и острыми вялыми параличами (в г. Москве, Хабаровском, Ставропольском краях, Свердловской, Омской областях, Санкт-Петербургском НИИЭМ им. Пастера (далее – РЦ), Приволжском и Дальневосточном региональных центрах по изучению энтеровирусных инфекций (Нижегородский, Хабаровский НИИЭМ), Национальном центре по лабораторной диагностике полиомиелита (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН) (далее – НЦ).

3.2. Указанные учреждения проводят отбор проб из ООС, подготовку их к исследованию, лабораторное исследование.

3.3. При выделении полиовирусов изоляты направляются для идентификации и внутритиповой дифференциации (далее – ВТД) в НЦ.

3.4. При выделении НПЭВ, следует выполнить их идентификацию (определение серотипа). НПЭВ с неустановленным серотипом следует отправить в РЦ или НЦ.

3.5. Вирусологическая лаборатория, которая не проводила идентификацию выделенного агента, проявившего цитопатический эффект (далее – ЦПЭ) на культуре клеток, должна отправить изолят в РЦ для исключения присутствия полиовируса.

3.6. При обнаружении в исследуемом образце РНК энтеровирусов методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (далее – ОТ-ПЦР) следует провести идентификацию вируса.

3.7. Результаты исследования материалов из ООС передаются в учреждения, направившие их.

4. Показания к проведению вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы

4.1. Планирование организации вирусологических исследований.

Вирусологические исследования материалов из ООС на полиовирусы, НПЭВ проводят в плановом порядке, внепланово и в рамках производственного контроля.

Плановые вирусологические исследования материалов из ООС осуществляют в течение определённого времени для получения информации о циркуляции полиовирусов, НПЭВ среди населения, если предполагается, что эффективность эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП недостаточна (или требуются дополнительные данные) и группа населения, в отношении которой предпринимается надзор, обладает одной из нижеперечисленных или несколькими особенностями:

- недостаточный охват иммунизацией;
- наличие сведений о недавней (или возможной) циркуляции в обследуемой группе населения дикого или вакцинородственного полиовируса;
- существование риска заноса дикого полиовируса из эндемичных (неблагополучных) по полиомиелиту стран (территорий).

Плановые исследования осуществляются в рамках эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП, энтеровирусными инфекциями, с научными целями.

Внеплановые вирусологические исследования материалов из ООС проводятся в случае непредвиденных изменений санитарно-эпидемиологической ситуации на определённой территории. Ими могут быть:

- установленный факт заноса дикого полиовируса или циркуляция вакцинородственного полиовируса;
- подъём заболеваемости населения энтеровирусными инфекциями;
- возникновение эпидемической вспышки энтеровирусной инфекции;
- авария или нарушения в системах водоснабжения или канализации, в результате которых может произойти интенсивное биологическое загрязнение поверхностных и подземных водоисточников, а также питьевой воды.

Для проведения плановых и внеплановых исследований на полиовирусы, НПЭВ составляется план проведения этих исследований, который должен включать:

- продолжительность и сроки отбора проб из ООС;
- характеристику группы населения, в отношении которой предпринимается исследование (численность населения, сведения об иммунизации против полиомиелита);
- распределение ответственности за сбор, обработку, исследование проб из ООС;
- наличие нормативных и методических документов, материального обеспечения для проведения исследований, протоколов проведения исследований;
- наличие обученного персонала и контроля качественного проведения исследований;
- определение порядка отчётности о результатах исследования;
- определение возможностей для своевременной пересылки выделенных штаммов вирусов (или РНК-позитивных материалов) для дальнейшего изучения в установленном порядке.

Исследования материалов ООС в рамках *производственного контроля* проводится постоянно с целью санитарно-вирусологической оценки производственных (технологических) процессов.

4.2. Объекты вирусологических исследований, места отбора, продолжительность исследований.

При проведении *плановых исследований* объектами исследований являются сточные воды, происходящие от той группы населения, в отношении которой предпринимается надзор. Места отбора проб выбираются вместе с представителями инженерной службы. В соответствии с целями исследования исследуют неочищенные сточные воды, при этом следует исключить стоки, которые могут быть загрязнены производственными отходами.

Большой объём сточных вод, поступающих на очистные сооружения или в канализационный коллектор, может снизить чувствительность обследования вследствие фактора разбавления. Поэтому в больших городах можно разбить обследуемое население на группы и обследовать небольшие фрагменты этих групп.

При проведении плановых исследований в соответствии с целями исследования также могут быть обследованы:

- сточные воды на этапах очистки и обеззараживания;
- вода поверхностных водоёмов, которые используются для целей рекреации, в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения;

• вода плавательных бассейнов;

• питьевая вода на различных этапах водоподготовки.

Продолжительность плановых исследований обычно составляет не менее 1 года, оптимальным сроком следует считать 3 года. Кратность сбора – 4 пробы в месяц, но не менее 2-х проб.

При проведении *внеплановых исследований* продолжительность исследования может быть более короткой, но кратность сбора проб должна быть увеличена, а выбор обследуемой группы населения – максимально точный.

Если исследования сточных вод обусловлены известной или подозреваемой реинтродукцией дикого полиовируса или появлением случаев полиомиелита, вызванных вакцинородственным полиовирусом (или случайной его детекцией), продолжительность исследования должна быть не менее 1 года, кратность отбора проб – не менее 4-х раз в месяц, а выбор целевой группы – максимально «прицельный».

Исследования *в рамках производственного контроля* проводятся в соответствии с рабочей программой и нормативными документами.

При планировании и организации любых исследований следует руководствоваться нормативными и методическими документами (прилож. 1).

5. Правила сбора, маркировки, хранения и транспортирования материалов для исследования

Существуют два принципа отбора проб материалов из ООС для исследований на полиовирусы, НПЭВ:

• одномоментный, при котором отбирают определённый объём воды в определённое время, или, что предпочтительнее, серию проб определённого объёма отбирают в разное, заранее намеченное время, чтобы затем составить смешанную пробу. Пробы, отобранные одномоментным способом подвергают последующему концентрированию с использованием фильтрующих мембран, ионообменных смол, с помощью метода двухфазного разделения (прилож. 2);

• «адсорбционный», при котором в ток воды на определённое время помещают адсорбирующий материал, а затем проводят элюцию вирусных частиц с адсорбента (метод Риордана, концентрирование на макропористом стекле) (прилож. 3).

Сотрудник, производящий отбор проб сточной воды, должен быть иммунизирован против полиомиелита. Если по техническим соображениям отбор проб выполняет сотрудник инженерно-технических служб, он также должен быть иммунизирован против полиомиелита.

Отбор проб производят только в защитной одежде – халате, закрытой обуви, резиновых перчатках. Для отбора проб воды одномоментным способом используют предназначенную для этих целей стерильную одноразовую посуду или стерильные ёмкости многократного применения, изготовленные из материалов, не оказывающих инактивирующего действия на вирусы. Ёмкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками или, что более предпочтительно, навинчивающимися крышками. Крышки должны надёжно предохранять содержимое ёмкости от протечек. При отборе проб адсорбционным методом пакет с адсорбентом помещают в плотный пластиковый мешок, не допускающий протечек.

Немедленно после отбора поверхность ёмкости, в которую была отобрана проба, протирают дезинфектантом, маркируют, помещают в термоконтейнеры/термосы, обеспечивающие температурный режим 4—8 °С и доставляют в лабораторию. Пробу сопровождают актом отбора проб с указанием места отбора, даты и времени отбора.

После доставки проб в лабораторию термоконтейнер (термос) распаковывают в отведённой для этого зоне, соблюдая правила биологической безопасности. В зоне, где происходит распаковка, должны иметься ёмкость для мусора, тампоны, смоченные 70 %-м раствором этилового спирта, биологическое защитное укрытие (далее – БЗУ) 2 класса защиты (или рабочий стол с покрытием, которое легко подвергается обработке лабораторными дезинфектантами).

Распаковка и регистрация материалов осуществляется двумя сотрудниками – один регистрирует поступившие материалы в рабочем журнале, другой открывает упаковку, проверяет целость ёмкостей с материалом, отсутствие протечек, полноту сопроводительных документов. В этот момент фиксируется состояние присланных проб – отсутствие протечек, соблюдение температурного режима, полнота документации.

Каждой пробе присваивают идентификационный номер, под которым она регистрируется в лабораторном журнале. Далее этим номером помечают все ёмкости (центрифужные пробирки, флаконы/пробирки с культурой клеток и пр.), относящиеся к данной пробе в процессе её исследования и хранения в данной лаборатории.

Обработку проб следует начать незамедлительно после доставки в лабораторию. Если обработка будет начата в течение 48 ч, пробы можно поместить в холодильник (0—8 °С). Если исследование будет начато позже, пробы, отобранные одномоментным методом, хранят при температуре –20 °С. Пробы, собранные адсорбционным методом, рекомендуется подготовить для исследования в течение 48 ч. В любом случае следует помнить, что исследование ООС предпринимается для получения

оперативной информации и последующего оперативного реагирования, поэтому пробы не должны накапливаться в лаборатории для ретроспективного исследования.

Все процедуры во время получения, распаковки и регистрации проб осуществляют в защитной одежде и резиновых перчатках.

6. Обработка проб из объектов окружающей среды в лаборатории

При обработке проб могут образовываться аэрозоли. Поэтому все работы по подготовке проб воды для исследования проводятся в БЗУ 2 -го класса защиты. Для исключения перекрёстной контаминации проб все манипуляции по подготовке к исследованию не следует совмещать с работой с материалами, полученными от случаев ПОЛИО/ОВП. Оптимально работа с пробами из ООС и с материалами, полученными от случаев ПОЛИО/ОВП, должна выполняться в разных помещениях и разными группами персонала.

Пробы из ООС готовят для исследования в зависимости от вида в соответствии с нормативными и методическими документами (прилож. 1).

При обработке одномоментно отобранных проб применяют концентрирование с помощью двухфазного разделения. При обработке проб, отобранных методом адсорбции на макропористом стекле (далее – МПС), проводят ступенчатую элюцию.

6.1. Обработка одномоментных проб и концентрирование вирусов методом двухфазного разделения.

До начала концентрирования пробу (1,0 л) делят на две части (по 500,0 мл) – одну часть подвергают концентрированию, другую хранят при –20 °С для возможного повторного исследования.

Объём осветлённой сточной воды смешивают с выбранными объёмами двух полимеров – декстрана и полиэтиленгликоля. Гомогенную смесь этих ингредиентов, полученную путём энергичного встряхивания, оставляют на ночь при 4 °С в делительной воронке. Это позволяет полимерам разделиться и сформировать в воронке два отчётливых слоя (две фазы). Энтеровирусы накапливаются в меньшем нижнем слое или на границе двух фаз (интерфаза). Нижний слой и интерфазу собирают капельным способом. Осадок после первоначального центрифугирования вносят в этот концентрат, взвесь обрабатывают хлороформом и проверяют наличие в ней вируса. Таким образом проба концентрируется в 50—100 раз.

6.2. Обработка проб, полученных методом адсорбции.

Выполняют ступенчатую элюцию вирусов, адсорбированных на МПС, помещённом в пакетики для сбора проб. МПС переносят в стеклянную колонку и медленно пропускают через колонку буферные растворы, собирая три элюата (фракции). Каждую фракцию обрабатывают хлороформом так, как это делается при обработке фекалий.

7. Порядок проведения лабораторных исследований

7.1. Выделение и идентификация вирусов.

7.1.1. Клеточные линии, рекомендуемые для выделения полиовирусов, других (неполио) энтеровирусов. Основные принципы работы.

Для максимально возможного выделения полиовирусов, НПЭВ из проб ООС следует использовать комбинации нескольких видов клеточных культур, чувствительных к полиовирусам и различным серотипам НПЭВ. Учитывая сведения о чувствительности различных клеточных культур к различным вирусам, наиболее подходящими для целей исследования культурами являются культуры RD, HEp-2, L20B, BGM. Культуры клеток должны быть получены по запросу из официальных источников (для НЦ таким источником являются лаборатории Глобальной лабораторной сети по полиомиелиту ВОЗ, для РЦ – НЦ). Для сохранения чистоты, аутентичности и стабильности клеточных культур следует заменять «рабочую» линию после 3-х мес. или 15 пассажей культивирования в лаборатории. Все манипуляции с культурами клеток фиксируют в рабочем журнале, обозначая тип клеток, номер пассажа, дату посева и все смены среды.

Все работы с неинфицированными культурами клеток проводятся в отдельном боксированном помещении, расположенном в «неинфекционной зоне» лаборатории, в БЗУ 2-го класса защиты. Для избежания перекрёстной контаминации между различными типами клеточных культур никогда не работают одновременно с несколькими культурами клеток. Все неинокулированные культуры клеток следует считать потенциально опасными, поэтому после окончания работы все культуральные жидкости и культуры обеззараживают автоклавированием.

При работе с культурами клеток, создании клеточных банков следует руководствоваться нормативными и методическими документами (прилож. 1).

Для контроля чувствительности клеток к полиовирусам проводят ежеквартальное титрование вакцинных штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1, 2 и 3 (референс-штаммы) на каждой из культур клеток после 8—10 пассажей.

7.1.2. Выделение и идентификация вирусов.

Выделение вирусов

Концентраты проб сточных вод и элюаты, полученные из проб, собранных методом адсорбции, исследуют на присутствие полиовирусов и НПЭВ так же, как исследуют пробы фекалий. Для проведения возможных повторных исследований одну четверть обработанной пробы (примерно 1,0 мл) замораживают и хранят при –20 °С.

Для исследования одной пробы используют культуру клеток площадью не менее 75 см^2, что эквивалентно трём флаконам ёмкостью 50,0 мл (25 см^2 клеточной поверхности в каждом). Выделение вирусов проводят на не менее чем двух культурах клеток, при этом одной из них должна быть высокочувствительная к вирусу полиомиелита и большинству НПЭВ культура клеток RD. Оптимальным является комбинация 3-х культур – RD, L20B, HEp-2. После замены ростовой среды на 7,5 мл поддерживающей среды в каждый флакон вносят 0,5 мл обработанной пробы. Все использованные клеточные культуры следует инокулировать одновременно. Обязательно оставляют по одному незаражённому контрольному флакону каждой культуры. Флаконы инкубируют в термостате при температуре 36 °С. Ежедневно, обычно в течение 5—7 дней, проверяют культуры на наличие ЦПЭ. Все признаки ЦПЭ, токсичности, контаминации посторонними микроорганизмами регистрируют в лабораторном журнале. При появлении ЦПЭ (при охвате изменениями 75 % клеточного монослоя) прекращают инкубацию флаконов и сохраняют культуральную жидкость при –20 °С для следующего пассажа на той же культуре клеток. Содержимое каждого флакона с культурой клеток пассируют индивидуально, флаконы никогда не объединяют. Для пассажа могут быть использованы культуры, выращенные в пробирках. Если при первичном заражении не наблюдали ЦПЭ, то делают так называемый «слепой» пассаж. Культуры, в которых не проявлялся ЦПЭ, инкубируют и наблюдают не менее 14 дней. При отсутствии ЦПЭ в течение этого срока независимо от количества предыдущих пассажей культуры отбрасываются как негативные.

При хорошем состоянии культуры клеток первичное заражение и один пассаж вместе составляют период наблюдения 14 дней. В ряде случаев (например, при выделении агента с низкой цитопатогенной активностью, или при наличии в пробе вируса в небольшом количестве) необходимо сделать последующие пассажи. При этом следует помнить, что каждый последующий пассаж увеличивает риск перекрёстной контаминации.

При выделении вирусов из проб воды различного происхождения на культуре клеток можно столкнуться с рядом нежелательных явлений.

Если при первичном заражении в культуре клеток развивается быстрая (в течение 1—2 дней после внесения исследуемого субстрата) дегенерация клеток, то, скорее всего, это связано с неспецифической токсичностью пробы. Такие культуры нужно заморозить при –20 °С, оттаять и выполнить пассаж. Если признаки токсичности обнаружатся вновь, то следует вернуться к исходной пробе, развести её фосфатно-солевым буфером (далее – ФСБ) 1 : 10 и повторить заражение. Бактериальная контаминация, которая проявляется в виде помутнения среды, приводит к гибели клеток и делает выявление вирусного ЦПЭ затруднительным или невозможным. В этом случае следует вернуться к исходной пробе, обработать её хлороформом и повторить процедуры заражения.

Особое внимание следует уделять предупреждению перекрёстной вирусной контаминации во время процедур заражения и пассирования. Нельзя сливать среду через край флакона или пробирки, в которые вносилась исследуемая проба, даже если ЦПЭ отсутствует. Удаление среды производят пипеткой, которую меняют после каждой процедуры.

При заражении с помощью автоматических микропипеток используют только наконечники с фильтрами. Следует избегать процедур, при которых образуются аэрозоли (например, энергичное пипетирование); не рекомендуется использование посуды с резиновыми пробками, которые помещаются внутрь горлышка флакона или пробирки. Следует использовать посуду с внешней резьбой на горлышке, которая закрывается завинчивающимися крышками.

Известно, что в пробах воды присутствуют смеси вирусов, с чем могут быть связаны затруднения при идентификации выделенных изолятов. Для разделения смесей и правильной идентификации выделенных вирусов, а также для того, чтобы избежать потери вирусов полиомиелита, все изоляты, «положительные» на культуре клеток RD, следует пассировать на клетки L20B. Наличие выраженного ЦПЭ указывает на присутствие в пробе вируса полиомиелита. Некоторые реовирусы, аденовирусы, а также НПЭВ могут проявлять ЦПЭ на клетках L20B и поэтому затруднять идентификацию выделенных изолятов и интерпретацию результатов исследования. Такие изоляты следует направить в соответствующую референс-лабораторию для заключительного исследования.

В лабораторной практике часто используется метод адсорбции исследуемого материала на клеточном монослое. При использовании этого метода из флакона/пробирки удаляют ростовую среду, ополаскивают монослой стерильным ФСБ, вносят исследуемую пробу и инкубируют флакон при температуре 36 °С в течение 1 ч. Таким образом создаются

лучшие условия для адсорбции вируса клетками, если он присутствует в пробе. После истечения срока инкубации в каждый флакон/пробирку вносят необходимое количество поддерживающей среды.

Применение этого метода может способствовать выявлению вируса при его незначительных количествах в исследуемом материале, а также ускорить проявление ЦПЭ по крайней мере на 1 сут. Однако преимущества этого метода перечеркиваются его недостатками, так как в результате дополнительных открываний крышек во много раз возрастает вероятность контаминации (перекрёстной вирусной или бактериальной).

Использование для выделения вирусов микропанелей для клеточных культур (6, 12, 24-луночных) с одной стороны увеличивает количество заражённых культур, что повышает шансы на выделение вируса, с другой – многократно увеличивает возможность контаминации. Поэтому использование микропанелей в рутинной лабораторной практике требует особой аккуратности.

Идентификация выделенных полиовирусов, других (неполио) энтеровирусов

Идентификацию выделенных штаммов полиовирусов, НПЭВ проводят в реакции нейтрализации инфекционности на культуре клеток с помощью микрометода. В основе реакции нейтрализации лежит взаимодействие исследуемого вируса с гомологичной сывороткой (или смесью антисывороток), которая нейтрализует вирус, что проявляется в виде отсутствия ЦПЭ на культуре клеток. В опыте по нейтрализации вирусную суспензию, содержащую 100 $ТЦД_{50}$, смешивают в равном объёме с диагностическими сыворотками в лунках планшета для микронейтрализации, инкубируют 1 ч при 36 °С, добавляют суспензию клеток, помещают в термостат, проводят ежедневное микроскопирование до получения окончательного результата идентификации (как правило, в течение 5 сут.).

Для идентификации используют сыворотки к полиовирусам типа 1, 2 и 3 и смеси иммунных к энтеровирусам сывороток, которые распространяются ВОЗ для лабораторий, включённых в глобальную лабораторную сеть по диагностике полиомиелита. Могут также быть использованы сыворотки к полиовирусам типа 1, 2 и 3 и к НПЭВ, зарегистрированные и разрешённые в Российской Федерации к применению в установленном порядке. Подготовку рабочих разведений сывороток/смесей сывороток проводят в соответствии с инструкциями производителя.

Проведение теста микронейтрализации, интерпретацию результатов выполняют в соответствии с нормативными и методическими документами (прилож. 1).

Типирование выделенного вируса проводят на той культуре, на которой он выделен. Если вирус выделен и на клетках RD, и на клетках L20B, проводят идентификацию на обеих культурах, при этом в первую очередь исследуют штамм, выделенный на L20B, для быстрого получения наиболее важного результата.

Если не удается определить серотип НПЭВ в реакции нейтрализации, то может быть выполнено частичное секвенирование участка генома VP1 этого штамма.

Выделенные штаммы полиовирусов в течение 7 дней после идентификации с нарочным или экспресс-почтой направляют в НЦ для проведения ВТД. Если при проведении идентификации на разных культурах клеток были получены одинаковые результаты, то в НЦ отправляют изолят, выделенный на какой-то одной культуре (предпочтение отдаётся культуре RD). При выявлении смеси полиовирусов в НЦ отправляют разделённые штаммы для подтверждения результатов и ВТД.

Если выделенные штаммы НПЭВ не были идентифицированы, то в течение 14 дней они должны быть отправлены для идентификации в РЦ или в НЦ (по договорённости). В РЦ или НЦ (по договорённости) отправляют также 5—10 идентифицированных штаммов в год для подтверждения результатов идентификации. При выявлении смеси полиовируса и НПЭВ в НЦ отправляют разделённые штаммы для подтверждения результатов и ВТД полиовируса.

7.1.3. Внутритиповая дифференциация полиовирусов.

Внутритиповую дифференциацию полиовирусов выполняет НЦ, используя для этого два метода, рекомендованные и поддерживаемые реагентами ВОЗ:

1) иммуноферментного анализа с использованием перекрёстно адсорбированных антисывороток, разработанных в Национальном институте охраны здоровья и окружающей среды (Билтховен, Нидерланды);

2) диагностической ПЦР, разработанный в Центре по контролю за заболеваниями, США.

ВТД подлежат все штаммы полиовирусов, выделенные в любой вирусологической лаборатории из любых ООС. ВТД должна быть проведена в течение 14 дней от момента получения (или выделения и идентификации) штамма в НЦ.

В случае получения противоречивых результатов двух методов ВТД, указывающих на принадлежность штамма полиовируса к дикому, вакцинородственному, присутствие в пробе смеси дикого и вакцинного

вируса одного типа, должно быть выполнено частичное секвенирование участка генома VP1 этого штамма полиовируса.

7.2. Выявление РНК полиовирусов и других (неполио) энтеровирусов методом ПЦР с этапом обратной транскрипции.

Основным преимуществом при использовании ПЦР для выявления РНК полиовирусов и других НПЭВ является высокая чувствительность метода и быстрое получение результатов исследования. Кроме того, ПЦР позволяет выявлять энтеровирусы, не вызывающие ЦПЭ на культуре клеток.

Свойственные ПЦР сложности включают необходимость строгого разделения этапов подготовки и амплификации, предотвращения перекрёстной контаминации. Организацию работы по выявлению РНК полиовирусов и НПЭВ осуществляют в соответствии с нормативными и методическими документами (прилож. 1).

Для детекции РНК используют ПЦР-тест-системы, зарегистрированные и разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

Проведение и интерпретация результатов реакции выполняется в соответствии с инструкцией производителя.

Существующие в РФ тест-системы не позволяют идентифицировать энтеровирусы до уровня серотипа, в связи с чем могут быть пропущены присутствующие в пробе полиовирусы или смеси полиовируса, других НПЭВ. Поэтому при обнаружении РНК энтеровируса методом обратной транскрипции и ПЦР необходимо провести выделение вируса на культуре клеток и его идентификацию, или его идентификацию молекулярными методами.

8. Сроки хранения материалов, полученных из объектов окружающей среды

Исходные материалы (образцы воды, собранные одномоментным методом, фракции, полученные при элюции с МПС, и пр.) хранят при –20 °С в течение 12 мес. от момента поступления в лабораторию, но не менее 3 мес. от момента подтверждения результата исследования в подтверждающей лаборатории соответствующего уровня.

Изоляты полиовирусов и НПЭВ хранят при –20 °С в течение 3 мес. от момента подтверждения результата исследования в подтверждающей лаборатории соответствующего уровня и получения результатов ВТД.

После истечения срока хранения материалы уничтожаются автоклавированием в установленном порядке.

9. Обеспечение биологической безопасности при проведении вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы

Следует учитывать, что ООС и полученные из них материалы и пробы могут содержать различные вирусы, поэтому при работе необходимо соблюдать меры предосторожности, обеспечить безопасность работы в соответствии с регламентирующими нормативными и методическими документами (прилож. 1).

При работе выполняются требования качественной микробиологической техники и соблюдаются следующие требования:

1. Доступ посторонних лиц в лабораторию ограничен. К работе допускаются сотрудники, только полностью иммунизированные против полиомиелита.

2. Работа в лаборатории проводится в лабораторной защитной одежде и лабораторной обуви с закрытыми носками.

3. Все перечисленные работы проводятся с полным соблюдением мер безопасности: регистрация проб, обработка проб, работа с пипетками, использование центрифуг, встряхивателей, холодильников, хранение инфекционных материалов, вскрытие ампул с инфекционным материалом, пересылка и транспортировка проб с инфекционным материалом.

4. В лаборатории запрещается приём пищи и питья, курение. В лабораторных помещениях и в хранилищах, где могут находиться инфекционные материалы, запрещается хранение пищи и питья.

5. Первичная обработка материала, заражение культур клеток, работы, связанные с использованием выделенных штаммов вирусов, проводят в резиновых перчатках в БЗУ 2-го класса защиты.

6. В каждом вирусологическом боксе должны быть инструкции по проведению каждого вида работ. Все приборы – центрифуги, БЗУ 2-го класса защиты и пр. должны иметь инструкции для работы с ними.

7. Контейнеры из-под первичного материала, использованная одноразовая посуда, наконечники микропипеток, микротитровальные планшеты, пипетки и прочее во время проведения работ собирают в пластиковые пакеты, предназначенные для автоклавирования. После окончания работ обеззараживают автоклавированием. Стеклянную посуду помещают в 6 %-й раствор перекиси водорода.

8. Обеззараживание рабочих поверхностей, оборудования проводят дезинфицирующими средствами с вирулицидной активностью, не со-

держащими хлора, и последующей обработкой ультрафиолетом в течение 30—60 мин.

9. Для снижения риска случайного инфицирования диким полиовирусом соблюдаются слудующие правила:

• использование дикого полиовируса прекращается во всех случаях, где ту же задачу можно выполнить при помощи аттенуированных вакцинных штаммов, инактивированных антигенов или НПЭВ;

• во всех случаях, когда нет программной или научной необходимости хранения полиовирусов, все запасы таких вирусов и потенциально инфицированных ими материалов следует уничтожить автоклавированием или сжиганием.

10. Лаборатории, сохраняющие дикие полиовирусы, должны выполнять следующие требования:

• если дикие полиовирусы необходимы для проведения исследований, то используют только штаммы, которые могут быть легко идентифицированы молекулярными методами;

• все виды работ с материалами, инфицированными или потенциально инфицированными дикими полиовирусами, проводят в БЗУ 2-го класса защиты;

• холодильники/морозильники, в которых хранят дикие полиовирусы, запираются (доступ к ключам ограничен), чётко маркируются как содержащие такие вирусы;

• инвентарные списки материалов, инфицированных или потенциально инфицированных дикими полиовирусами, должны быть полными, включать сведения о происхождении материала, источнике, дате сбора, количестве, расположении в холодильнике;

• материалы, инфицированные или потенциально инфицированные дикими полиовирусами, хранят в пластиковых пробирках с завинчивающимися крышками и непротекающих прочных контейнерах, переносят из холодильника в холодильник в непротекающих прочных вторичных контейнерах.

10. Интерпретация результатов, полученных при проведении вирусологических исследований материалов из объектов окружающей среды на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы

Частота обнаружения полиовирусов, других НПЭВ в пробах из ООС может быть одним из критериев эффективности проведения исследований. В странах, использующих для иммунизации против полиомие-

лита оральную полиомиелитную вакцину (далее – ОПВ), вирусы, происходящие из вакцины, должны выявляться в течение всего года, особенно интенсивно – во время проведения дополнительных мероприятий по иммунизации.

Если частота выявления энтеровирусов в лаборатории менее 30 % в пробах, полученных одномоментным методом, и менее 10 % в пробах, полученных адсорбционным методом, то это может указывать на существование недостатков или нарушений при проведении отбора проб, транспортирования, обработки, лабораторного исследования. В этом случае лаборатории следует проанализировать весь ход проведения исследований. Если нарушений в лабораторном компоненте не выявлено, следует вместе с эпидемиологами оценить правильность выбранных объектов и мест отбора проб. Следует обратиться за консультацией в РЦ или НЦ.

Выделение дикого вируса полиомиелита из пробы ООС равнозначно выявлению случая паралитического полиомиелита, вызванного диким полиовирусом. В этом случае необходимо выяснить, связано ли появление дикого вируса с его недавним заносом на обследуемую территорию, или имеет место циркуляция дикого вируса среди населения. Все действия в этом случае должны находиться в соответствии с нормативными и методическими документами (прилож. 1).

Необходимо усилить надзор за ПОЛИО/ОВП среди населения, организовать более частое и прицельное взятие проб из ООС, оценить работу по иммунизации населения против полиомиелита.

При выявлении вакцинородственных полиовирусов, обладающих значимой для программы ликвидации полиомиелита степенью дивергенции от вакцинного предка на участке генома VP1 (> 1 %), необходимо выяснить, с чем связана такая находка – случайное выделение индивидуальным экскретором, циркуляция, импортация и пр.

Положительный результат, полученный методом ОТ-ПЦР, при отрицательном результате исследования на культуре клеток, скорее всего, говорит о присутствии в пробе нецитопатогенного НПЭВ. В этом случае для получения окончательного результата исследования пробы следует провести идентификацию вируса молекулярными методами.

Приложение 1

Нормативные и методические ссылки

1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. Положение о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. № 322.

3. Положение об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации. Утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 15 сентября 2005 г. № 569.

4. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании. Утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554.

5. СП 3.1./3.2.1379—03 «Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных болезней».

6. СП 1.1.1058—01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

7. СП 1.1.2193—07 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Изменения и дополнения 1 к СП 1.1.1058—01.

8. СП 3.5.1378—03 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации и осуществлению дезинфекционной деятельности».

9. Отраслевой стандарт ОСТ 42-21—85. «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы».

10. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

11. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

12. СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

13. СП 1.3.1325—03 «Безопасность работы с материалами, инфицированными или потенциально инфицированными диким полиовирусом».

14. СП 1.3.1318—03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I—IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами».

15. СП.3.1.2260—07 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования материалов, инфицированных или потенциально инфицированных диким полиовирусом».

16. СанПиН 2.1.7.728—99) «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

17. ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».

18. МУ № 287—113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» от 30.12.98.

19. МУ № 15/6-5 «Методические указания по контролю работы паровых и воздушных стерилизаторов» от 28.02.91.

20. МР 02.007—06 «Использование электромагнитного излучения сверхвысокой частоты для обеззараживания инфекционных медицинских отходов».

21. Р 3.5.1904-04. «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях».

22. МУ № 11-16/03-06 «Методические указания по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях» от 28.02.95.

23. Инструкция по эксплуатации и контролю эффективности вентиляционных устройств на объектах здравоохранения, утв. МЗ СССР 20.03.75.

24. МУ 3.1.1.2130—06 «Энтеровирусные заболевания: клиника, лабораторная диагностика, эпидемиология, профилактика».

25. МУ 4.2.2029—05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов».

26. МУ 1.3.1888—04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III—IV групп патогенности».

27. МР № 0100/8607-34 «Организация контроля за квалификационным уровнем персонала вирусологических лабораторий по вопросам безопасного лабораторного хранения материала, инфицированного или потенциально инфицированного диким полиовирусом» от 23.08.07.

28. МР «Организация работы по обеспечению безопасного лабораторного хранения диких полиовирусов» от 12.11.01.

29. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита.—4-е изд. ВОЗ, Женева, 2005.

30. Рекомендации по надзору за вирусом полиомиелита в окружающей среде. ВОЗ, Женева, 2003.

31. Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусами для поддержки программы ликвидации полиомиелита. ВОЗ, Женева, 2005.

32. Глобальный план действий для обеспечения безопасного лабораторного хранения диких полиовирусов. ВОЗ. Женева, 2000.

33. Рекомендации по обеспечению безопасного лабораторного хранения дикого полиовируса. ВОЗ, Женева, 2000.

34. Руководство по лабораторной безопасности.—3-е изд. ВОЗ, Женева, 2004.

35. Национальный план действий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации. Утв. МЗиСР 17.03.06.

Приложение 2

Концентрирование проб сточных вод методом двухфазного разделения

1. Подготовка реактивов (для двух проб по 1,0 л).

1.1. 22 %-й декстран (по весу) – 40 г декстрана Т40, 142 мл стерильной дистиллированной воды. Для растворения используют магнитную мешалку. Готовый раствор можно хранить 2 нед. при 4 °С.

1.2. 29 %-й ПЭГ 6000 (по весу) – 363 г ПЭГ 6000 и 888 мл стерильной дистиллированной воды. Для растворения используют магнитную мешалку. Готовый раствор можно хранить 2 нед. при 4 °С. Раствор можно автоклавировать (15 мин при 45 °С).

1.3. 150 мл (примерно) 5М NaCl.

1.4. 1N NaOH и 1N HCl для установки pH.

2. Концентрирование пробы (0,5 л).

2.1. Жидкость пробы центрифугируют в течение 10 мин при 1 000 g (если это необходимо, пробу делят на несколько порций), надосадочную жидкость переносят из пробирок в колбу Эрленмейера ёмкостью 1,0 л. Осадок хранят при 4 °С.

2.2. Доводят pH надосадочной жидкости до нейтрального уровня (7,0—7,5). Обычно для этого требуется несколько миллилитров 1N раствора NaOH. Измеряют конечный объём надосадочной жидкости.

2.3. К 500 мл надосадочной жидкости добавляют 39,5 мл 22 %-го раствора декстрана, 287 мл 29 %-го раствора ПЭГ 6000 и 35 мл 5N раствора NaCl. Тщательно перемешивают, используя прибор горизонтального встряхивания или магнитную мешалку, и выдерживают 1 ч при температуре 4 °С.

2.4. Для каждой пробы подготавливают стерильную коническую делительную воронку и закрепляют её в штативе. Смазывают скользящие поверхности кранов, но так, чтобы не закрыть в них отверстие, проверяют плотность кранов небольшим количеством воды. Смесь, приготовленную, как указано в п. 2.3, переливают в воронку и оставляют на ночь при 4 °С.

2.5. На следующее утро осторожно открывают кран воронки, медленно выпускают жидкость и собирают в стерильную пробирку её нижний слой и промежуточную фазу (обычно 5—10 мл от каждой пробы объёмом 0,5 л).

2.6. К жидкости, собранной в пробирке (п. 2.5), добавляют осадок (п. 2.1), хлороформ (20 % от объёма образовавшейся взвеси), встряхивают в течение 1 мин. Центрифугируют (20 мин при 1 500 g), отбирают водную фазу в стерильную пробирку и добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин до конечной концентрации 100 МЕ/мл и 100 мг/мл соответственно).

2.7. Одну часть полученного концентрата (1 мл) хранят при температуре –20 °С (или –70 °С, если есть возможность) для повторного исследования, если возникнет такая необходимость. Вторую часть концентрата используют для выделения вирусов на культуре клеток или детекции РНК методом ОТ-ПЦР.

Приложение 3

Сбор проб воды с помощью пакетов с макропористым стеклом и последующая обработка

Метод используют для концентрирования вирусов из сточной воды, воды поверхностных водоёмов. Метод может быть использован для концентрирования вирусов из питьевой воды при небольшой модификации способа сбора: пакет с сорбентом помещают в ёмкость, через которую медленно протекает исследуемая вода, и оставляют на 1—3 сут. так, чтобы пакет всё время находился погружённым в воду.

1. Сбор проб.

1.1. Подготовка МПС.

Для повышения сорбционных свойств МПС его обрабатывают следующим образом:

- готовят смесь из 1 части 3 %-го раствора H_2O_2 и 1 части 6 М раствора HCl;
- добавляют 1 объём МПС к 1 объёму этой смеси и кипятят в открытом сосуде в вытяжном шкафу в течение 1 ч;
- промывают МПС дистиллированной водой до нейтрального pH и высушивают при 100 °С;
- в пакет из водопроницаемого материала (флизилина) размером 5 x 7 см помещают 3 $см^3$ подготовленного МПС.

1.2. Отбор проб.

Пакет с сорбентом с помощью прочной лески закрепляют в токе воды. После экспозиции в течение 3—7 сут. пакет вынимают, помещают в полиэтиленовый мешок или стерильный флакон, затем в термоконтейнер, обеспечивающий поддержание температурного режима 4—8 °С, доставляют в лабораторию в максимально короткий срок. Пробу маркируют, указывая на упаковочном пакете точку отбора, время экспозиции пакета. До обработки пробу можно хранить не более суток при 4 °С.

2. Обработка проб.

2.1. Предварительная подготовка стеклянных колонок.

Для предотвращения нежелательной адсорбции вирусов на стенках колонки смачивают их внутреннюю поверхность раствором силикона, сливают эту жидкость и выдерживают колонки 1 ч при 100 °С. Слитую силиконовую жидкость можно использовать повторно.

2.2. Обработка проб.

Пакет с сорбентом извлекают из упаковочного полиэтиленового мешка и помещают в стерильную чашку Петри. Обрезают верхний край пакета, сорбент вымывают при помощи стерильной пипетки стерильной дистиллированной водой (примерно 5,0 мл) и с помощью пипетки (или через воронку) переносят в колонку объёмом 5—10 мл. Вирусы элюируют последовательно тремя порциями стерильных растворов по 3,0 мл каждый:

1) 0,05 М Трис-HCl pH 9,1;

2) 0,05 М Трис-HCl pH 9,1 с 0,5 М NaCl;

3) 3 % говяжий экстракт на 0,05 М Трис-HCl pH 9,1.

Каждую из 3-х фракций (элюатов) собирают и исследуют отдельно. До исследования фракции обрабатывают хлороформом. Для этого добавляют $^1/_2$ объёма хлороформа на один объём элюата, тщательно встряхивают 10 мин и центрифугируют при 1 500g 10 мин, чтобы разделить фазы. Водную верхнюю фазу переносят пипеткой в стерильный флакон, добавляют пенициллин и стрептомицин до конечной концентрации 100 МЕ/мл и 100 мг/мл соответственно.

2.3. Приготовление растворов для элюции вирусов с МПС.

Готовят 10-кратные концентраты элюирующих растворов на дистиллированной воде.

Раствор 1

Растворяют 30,3 г триса (трис гидроксиметил аминометан) в 300—400 мл воды, доводят значение pH до 9,1 концентрированной HCl и оставляют на сутки. Проверяют значение pH, при необходимости доводят ещё раз. Добавляют дистиллированную воду до конечного объёма раствора 500 мл.

Раствор 2

Растворяют 30,3 г триса + 145 г NaCl в 300—400 мл воды, доводят значение pH до 9,1 концентрированной HCl и оставляют на сутки. Проверяют значение pH, при необходимости доводят ещё раз. Добавляют дистиллированную воду до конечного объёма раствора 500 мл.

Раствор 3

150 г мясного экстракта + 350 мл трис-HCl pH 9,1.

Растворы автоклавируют 15 мин при 1 атмосфере.

Рабочие разведения получают добавлением 9 частей стерильной дистиллированной воды к 1 части концентрированного раствора.

Приложение 4

Направление на вирусологическое исследование материалов из объектов окружающей среды

Название учреждения, лаборатории	
Адрес	
Телефон	
Факс	
E-mail	
Вид пробы (нативная, изолят)	
Происхождение пробы (вода сточная, открытых водоёмов и пр.)	
Место отбора	
Дата отбора	
Способ отбора	
Результаты идентификации	
Дата отправки в РЦ/НЦ	

Приложение 5

Список лабораторий Российской Федерации по диагностике полиомиелита

	Лаборатория	Адрес	Телефон	Факс	Электронный адрес
1	НЦ по лабораторной диагностике полиомиелита (ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН)	142782, Московская обл., п/о Института полиомиелита	(495) 439 90 54	(495) 439 93 21 (495) 549 67 60	poliom@aha.ru
2	Региональный Центр по надзору за ПОЛИО/ОВП в ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» Роспотребнадзора	129626, г. Москва, Графский переулок, 4/9	(495) 687 36 16	(495) 687 40 39	poliolab@mossanepid.ru
3	Региональный Центр по надзору за ПОЛИО/ОВП в ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области» Роспотребнадзора	644116, г. Омск, 27-я Северная, 42а	(3812) 68 08 37		polioom@mail.ru
4	Региональный Центр по надзору за ПОЛИО/ОВП в ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» Роспотребнадзора	620219, г. Екатеринбург, Отдельный пер., 3	(343) 374 35 96	(343) 374 47 03	polioekb@ ocsen.utk.ru
5	Региональный Центр по надзору за ПОЛИО/ОВП в ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае» Роспотребнадзора	355008, г. Ставрополь, ул. Фадеева, 4	(865) 294 65 93	(865) 294 6854	poliost@ avn.skiftel.ru
6	Региональный Центр по надзору за ПОЛИО/ОВП в ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае» Роспотребнадзора	680009, г. Хабаровск, ул. К. Маркса, 109б	(421) 227 47 72	(421) 227 47 81	poliokhv@ mail.redcom.ru
7	Региональный Центр по надзору за ПОЛИО/ОВП в ФГУН НИИЭМ им. Пастера, г. Санкт-Петербург	197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, 14	(812) 233 21 56	(812) 232 92 17	poliospb@ nr3854.spb.edu